

## ОСОБЕННОСТИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *E.COLI* И *C.ALVICANS*, ОБРАЗУЮЩИХ БИОПЛЕНКУ

АРТЮХ Т. В., СОКОЛОВА Т. Н., ОСТРОВСКАЯ О.Б.

Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2021. – Том 20, №1. – С. 46-54.

## THE RESISTANCE PECULIARITIES OF *E.COLI* AND *C.ALVICANS* CLINICAL ISOLATES FORMING A BIOFILM

ARTSIUKH T.V., SOKOLOVA T.N., ASTROWSKAJA A.B.

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2021;20(1):46-54.

### Резюме.

Цель – изучение способности к пленкообразованию *C.albicans* и *E.coli*, выделенных у пациенток с вагинитами, а также их чувствительности к доксициклину, амоксиклаву, офлоксацину, флуконазолу, клотримазолу в планктонном виде и в составе моно- и микст-биопленок.

Материал и методы. В ходе исследования изучались свойства и способность к пленкообразованию *C.albicans* 2924 и *E.coli* 2646, выделенных со слизистых у пациенток с клиническими признаками вагинита. Определялись минимальная подавляющая концентрация (МПК) и минимальная бактерицидная концентрация (МБК) антибиотиков для планктонных форм микроорганизмов: бактерий и кандид в составе моно-биопленки, а также в составе микст-биопленки.

Результаты. Выявлено, что исследуемые микроорганизмы способны образовывать биопленку. При изучении чувствительности микроорганизмов в составе биопленок (БП) выявлено, что МПК препаратов для моно-биопленок возрастают в 2-4 раза, для микст-биопленок в 2,5-8,5 раза относительно МПК препаратов для планктонных форм *E.coli* и *C.albicans*. Бактерицидные концентрации амоксиклава, офлоксацина, доксициклина, флуконазола, клотримазола для планктонных форм являются неэффективными для биопленочных форм этих же микроорганизмов. Заключение. Определение чувствительности микроорганизмов в составе БП к антибактериальным препаратам необходимо для назначения рациональной антибиотикотерапии и разработки протоколов эмпирической антибактериальной терапии. Актуальным является изучение механизмов резистентности бактерий в составе биопленки, разработка новых фармацевтических препаратов с высоким потенциалом действия на биопленки, так как стандартная терапия высокими дозами антибиотиков (АБ) токсична для макроорганизма, что диктует необходимость апробации новых средств.

**Ключевые слова:** резистентность, микробные пленки, антибиотики, антимикотические препараты, минимальная подавляющая концентрация.

### Abstract.

**Objectives.** To model biofilms of mixed paired cultures of *C.albicans* and *E.coli* in vitro and study the characteristics of their sensitivity to antimicrobial drugs (doxycycline, amoxiclav, ofloxacin, fluconazole, clotrimazole) in planktonic form, as well as in the composition of mono- and mixed biofilms.

**Material and methods.** In the course of the study, the properties and ability to film formation of *C.albicans* 2924 and *E.coli* 2646 isolated from mucous membranes in patients with clinical signs of vaginitis were investigated. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of antibiotics were determined for planktonic forms of microorganisms: bacteria and candida in the composition of a mono-biofilm, as well as in the composition of a mixed biofilm.

**Results.** It has been revealed that the studied microorganisms are capable of forming a biofilm. On studying the sensitivity of microorganisms in biofilms (BF) it has been found that the MIC of preparations for mono-biofilms increases 2-4 times, for mixed biofilms 2.5-8.5 times compared to the MIC of preparations for planktonic forms of *E.coli* and *C.albicans*.

Bactericidal concentrations of amoxiclav, ofloxacin, doxycycline, fluconazole, clotrimazole for planktonic forms are not effective for biofilm forms of the same microorganisms.

Conclusions. To determine the sensitivity of microorganisms in the composition of biofilms to antibacterial drugs is necessary for the administration of rational antibiotic therapy and the development of empirical antibiotic therapy protocols. It is important to study the mechanisms of bacterial resistance in the composition of biofilms, develop new pharmaceuticals with a high potential for action on biofilms, since standard therapy with high doses of antibiotics (AB) is toxic for the macroorganism, which dictates the need to test new agents.

*Key words: resistance, microbial films, antibiotics, antimycotic drugs, minimum inhibitory concentration.*

18 июня 2019 во Всемирной организации здравоохранения объявили о запуске новой глобальной кампании по борьбе с лекарственной устойчивостью [1]. По данным ВОЗ, около 50 процентов антибиотиков (АБ) используются не по назначению [2]. Мониторинг устойчивости к антибактериальным средствам клинически значимых микроорганизмов – неотъемлемое звено системы инфекционного контроля в странах, где реализуется программа по сдерживанию резистентности бактерий к АБ [1-3].

Проблему резистентности все чаще рассматривают в свете того факта, что 95-99% микроорганизмов в природных местах обитания существуют в виде биопленок [4, 5]. Биопленка – это колония микроорганизмов (15%) в матрице синтезированного ими внеклеточного полимерного вещества (85%). Внеклеточный матрикс является барьером для действия иммунных клеток и антибактериальных веществ [6]. Регуляторные системы в биопленке работают по принципу феномена, получившего название «ощущение кворума» (от англ. Quorum sensing; QS) [7,8]. QS-регуляция дает возможность бактериям скоординированно контролировать экспрессию генов популяции [9]. В этом типе поведения бактерии используют преимущества, которые не были доступны им как индивидуальным клеткам, проявляя сходство с «социальным» поведением многоклеточных организмов [10].

Биопленке присуще множество уникальных и еще до конца не изученных качеств. Одним из клинически значимых свойств бактерий в составе биопленок является более высокая устойчивость к АБ в сравнении с их свободно живущими аналогами. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) и минимальная бактерицидная концентрация (МБК) антибиотиков в отношении бактерий в биопленках может в тысячи раз превышать этот показатель для планктонных форм бактерий [11]. По этой причине инфекци-

онный процесс может приобретать хронические и рецидивирующие формы [12]. В связи с гетерогенностью консорциума механизмы, отвечающие за резистентность, функционируют в биопленке одновременно, обеспечивая высокие уровни антибиотикорезистентности. Эти механизмы в корне отличаются от механизмов устойчивости, используемых планктонными клетками.

Предложено несколько механизмов резистентности биопленок к антибиотикам. В основе их заложен принцип многоклеточного организма:

- физический барьер, за счет синтезированных клетками экзополисахаридов, внеклеточной ДНК, белков и липидов [13, 14];
- изменение метаболизма в биопленке [15-17];
- генетический механизм – обмен плазмидами, ответственными за резистентность к антибиотикам.

Таким образом, биопленки могут увеличивать распространение мультирезистентных бактерий [18].

На основании мониторинга этиологической структуры бактериальных инфекций ведущими возбудителями мочеполовой системы являются грамотрицательные микроорганизмы, принадлежащие к семейству *Enterobacteriaceae*. Наиболее частый представитель этого семейства – *E.coli* [19]. Их ведущая этиологическая значимость обусловлена доминированием среди факультативно-анаэробной флоры кишечника, откуда они попадают во влагалище [20]. Кишечные палочки характеризуются наличием большого числа факторов патогенности, обеспечивающих существование палочек в моно- и микст-биопленках [21]. При попадании во влагалище кишечные палочки неизбежно вступают в сообщества с грибами рода *Candida*.

Носительство дрожжеподобных грибов в человеческой популяции достигает 80%. Среди инфекционных поражений грибами рода *Candida* лидирует вульвовагинитный кандидоз [22]. По

данным литературы, 3/4 женского населения мира в течение жизни переносят хотя бы 1 эпизод вульвовагинита, причем в 25-30% случаев он вызван грибами *C.albicans* [23]. Факторы вирулентности дрожжеподобных грибов играют ключевую роль в столь высокой распространенности [24]. Среди них наибольшее значение играют следующие: адгезины, обуславливающие адгезию гриба к клеткам хозяина; кислотные протеазы и фосфолипазы, обеспечивающие проникновение и повреждение клеточных оболочек; диморфизм – морфологическая структура зависит от pH среды; способность формировать биопленки. *C.albicans* производит количественно большую и структурно более сложную биопленку, чем другие представители дрожжеподобных грибов [25].

### Материал и методы

Исследование проводилось на клинических штаммах *E.coli* 2646 и *C. albicans* 2924, выделенных у больных с вагинитами. Изучалась способность данных штаммов к пленкообразованию с использованием электронной микроскопии. Определялась их чувствительность к доксициклину, амоксиклаву, офлоксацину, флуконазолу, клотримазолу в различных формах существования (планктонной, моно- и микст-биопленках). Проводился сравнительный анализ чувствительности к препаратам для разных форм существования микроорганизмов.

Эксперимент проводился с соблюдением определенных правил, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами [26]. Определение МПК антибактериальных препаратов выполнялось методом серийных разведений в бульоне, в работе руководствовались системой предельных значений EUCAST [27]. Использовали суточную культуру микроорганизмов, выращенную на скошенном мясопептонном агаре в концентрации  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл ед. (0,5 ед. по Мак-Фарланду) для *E.coli* и  $6 \times 10^8$  КОЕ/мл ед. (2 ед. по Мак-Фарланду) для *C.albicans* в стерильном физиологическом растворе хлорида натрия. Концентрацию микробных тел контролировали измерением оптической плотности растворов по шкале McFarland на детекторе мутности суспензий DEN-1 Biosan. Результат измерения зависит от размеров микроорганизмов. Представленные числовые значения стандарта мутности по Мак-Фарланду являются средними для бактерий. Для

дрожжевых микроорганизмов, размеры которых больше, эти значения должны быть разделены на 30 [28]. Антимикотики и антибиотики растворяли и титровали в 96-луночных U-образных планшетах в концентрациях от 1000 мкг/мл до 7,5 мкг/мл. В каждую лунку планшета к разведениям препаратов в бульоне Мюллера-Хинтона для *E.coli* и бульоне Сабуро для *C.albicans* вносили 20 мкл инокулята. Контролем служили питательная среда с культурой микроорганизмов без препарата и питательная среда с антибиотиком. Планшеты с культурой инкубировали при 35°C в течение 24 часов. Результаты учитывали визуально в проходящем свете по определению наличия роста культур в опытных и контрольных лунках. МПК определяли по наименьшей концентрации АБ, которая подавляла видимый рост микроорганизма [29]. Помутнение среды указывает на наличие высокой численности бактерий (более  $10^7$  кл/мл), что свидетельствует о резистентности микроорганизмов к препарату [30]. Затем проводился посев из лунок на чашки: мясопептонный агар для *E.coli* и среду Сабуро для *C.albicans*, с последующим определением МБК – наименьшая концентрация препарата, при которой отсутствует бактериальный рост в виде колоний микроорганизмов. Экспозиция 24 ч. при 35°C.

Для выращивания моно- и микст-биопленок использовали стерильные 96-луночные полистироловые U-образные планшеты. В каждую лунку вносили по 100 мкл бульона, 20 мкл взвеси микроорганизмов помещали в термостат для инкубации. Для контроля роста биопленки под электронным микроскопом в лунки помещали специальные медные сеточки диаметром 3,5 мм, покрытые формваровой плёнкой. В течение трех дней ежедневно проводили промывание лунок фосфатным буферным раствором (pH 7,2-7,4) для удаления планктонных клеток, затем вносили свежую питательную среду и продолжали инкубировать, а также делали отбор некоторых из них для исследования ультраструктуры биопленки с помощью трансмиссионной электронной микроскопии: микроскоп JEM 1011 (JEOL, Япония), ускоряющее напряжение 80 KV. Произвели отбор 10 препаратов-сеточек, для каждого образца сделали по 10 фотографий в последовательно случайном поле зрения.

Для изучения действия препаратов на 4-е сутки после промывки поставили двойные разведения (1000 мкг/мл – 7,5 мкг/мл) антибиотиков и продолжали инкубировать [31]. Через 24 часа (на

5-й день) каждую лунку промывали фосфатным буферным раствором, затем туда вносили свежую питательную среду и 1% раствор резазурина для регистрации окислительно-восстановительного потенциала в лунках. Изменение цвета резазурина отражало активность действия препарата на биопленку. В результате бактериостатического или бактерицидного действия антибиотика микроорганизмы не проявляют жизнедеятельности, и цвет резазурина не изменялся (синий). При устойчивости микроорганизма к антибиотику индикатор менял цвет на розовый [32]. Результат регистрировали через 1, 2, 3, 6 и 18-24 часа. Изменение окраски в опытных лунках по времени и интенсивности окраски сравнивали с контрольными. Результаты МПК и МБК препаратов для биопленок, полученные по методике с использованием резазурина, сравнивали с результатами электронной микроскопии.

Для каждой пары «микроб-антибиотик» в форме планктона и биопленок было выполнено три повтора эксперимента. Математическая и статистическая обработка результатов выполнялась средствами Microsoft Excel 2010, а также пакета для статистической обработки данных Statistica 10.

## Результаты и обсуждение

Результаты электронной микроскопии показали, что исследуемые микроорганизмы *E.coli* 2646 и *C.albicans* 2924 способны образовывать биопленку. Кишечные палочки, адгезированные на поверхности кандид, являются признаком истинной биопленки, в отличие от агаровых колоний, которые достаточно часто представляют как биопленки (рис. 1). МПК и МБК мкг/мл препаратов проанализированы с использованием описательной статистики, представлены в таблице 1, диаграммах размаха (рис. 2). Наибольшую активность в отношении планктонной формы *E.coli* проявляет офлоксацин – 15 мкг/мл, в составе монопленки 60 мкг/мл, в составе микст-пленки 120 мкг/мл. Наименьшую активность в отношении *E.coli* проявляет амоксиклав – 500 мкг/мл, в составе монопленки 1000 мкг/мл, в составе микст-пленки 1000 мкг/мл. В отношении планктонной формы *C.albicans* активен флуконазол – 15 мкг/мл, в составе монопленки 500 мкг/мл, в составе микст-пленки 1000 мкг/мл. Клотримазол не оказывает эффективного воздействия на планктонную форму кандид. Бактериостатические концентрации препаратов для биопленок, полученные

Таблица 1 – Данные описательной статистики, значения МПК и МБК препаратов по формам существования микроорганизмов

Показатель	Микро-организм	Препарат	Мин.	Макс.	Сред.	Ст. откл.	Меди-ана	Ниж. кварт.	Верх. кварт.
МПК для планктонных форм, мкг/мл	<i>E.coli</i>	амоксиклав	500	500	500	0	500	500	500
	<i>E.coli</i>	офлоксацин	10	20	15	5	15	10	20
	<i>E.coli</i>	доксидиклин	25	35	30	5	30	25	35
	<i>C.albicans</i>	флуконазол	15	15	15	0	15	15	15
	<i>C.albicans</i>	клотримазол	500	500	500	0	500	500	500
МБК для планктонных форм, мкг/мл	<i>E.coli</i>	амоксиклав	1800	2200	2000	200	2000	1800	2200
	<i>E.coli</i>	офлоксацин	25	35	30	5	30	25	35
	<i>E.coli</i>	доксидиклин	55	65	60	5	60	55	65
	<i>C.albicans</i>	флуконазол	900	1100	1000	100	1000	900	1100
	<i>C.albicans</i>	клотримазол	1800	2200	2000	200	2000	1800	2200
МПК для монопленок, мкг/мл	<i>E.coli</i>	амоксиклав	1000	1000	1000	0	1000	1000	1000
	<i>E.coli</i>	офлоксацин	50	70	60	10	60	50	70
	<i>E.coli</i>	доксидиклин	120	120	120	0	120	120	120
	<i>C.albicans</i>	флуконазол	450	550	500	50	500	450	550
	<i>C.albicans</i>	клотримазол	1000	1000	1000	0	1000	1000	1000
МПК для микст-пленок, мкг/мл	<i>E.coli</i> + <i>C.albicans</i>	амоксиклав	1000	1000	1000	0	1000	1000	1000
		офлоксацин	110	130	120	10	120	110	130
		доксидиклин	250	250	250	0	250	250	250
		флуконазол	1000	1000	1000	0	1000	1000	1000
		клотримазол	1000	1000	1000	0	1000	1000	1000

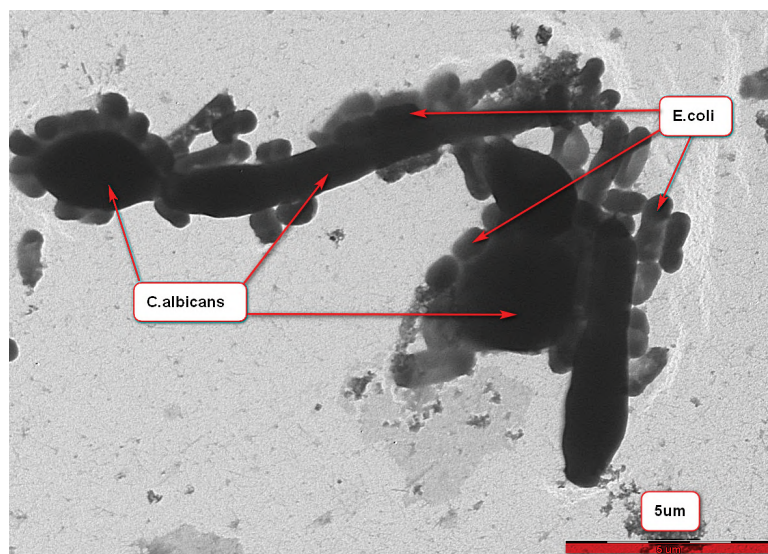


Рисунок 1 – Микст-био пленка *E.coli* + *C. albicans* при воздействии МБК препаратов для планктонных форм: доксициклин 60 мкг/мл + флуконазол 1000 мкг/мл; Ув. 5000; мерный отрезок равен 5 мкм.

с использованием индикатора, подтверждаются результатами электронной микроскопии.

Бактерицидная концентрация амоксиклава для *E.coli* 2000 мкг/мл, офлоксацина 30 мкг/мл, доксициклина 60 мкг/мл. МБК флуконазола для *C.albicans* 1000 мкг/мл, клотримазола 2000 мкг/мл. Бактерицидного эффекта доксициклина, амоксиклава, офлоксацина, флуконазола, клотримазола в исследуемых концентрациях веществ для микроорганизмов в составе моно- и микст-био пленок достигнуто не было (рис. 1).

Диаграммы размаха отражают МПК амоксиклава, офлоксацина и доксициклина по отношению к *E.coli*, флуконазола и клотримазола к *C.albicans*, что продублировано в таблице 1.

При изучении чувствительности микроорганизмов в составе био пленок на основании усредненных значений описательной статистики выявлено, что МПК препаратов для моно-био пленок пропорционально возрастают в 2-4 раза, для микст-био пленок в 2,5-8.5 раза относительно МПК препаратов для планктонных форм *E.coli* и *C.Albicans* (рис. 3). Полученные результаты подтверждаются данными других исследователей [11].

Бактерицидная концентрация препаратов для планктонных форм не оказала бактерицидного эффекта на микроорганизмы в составе био пленки. Изучение био пленочных структур под электронным микроскопом при воздействии концентрациями препаратов, которые являлись

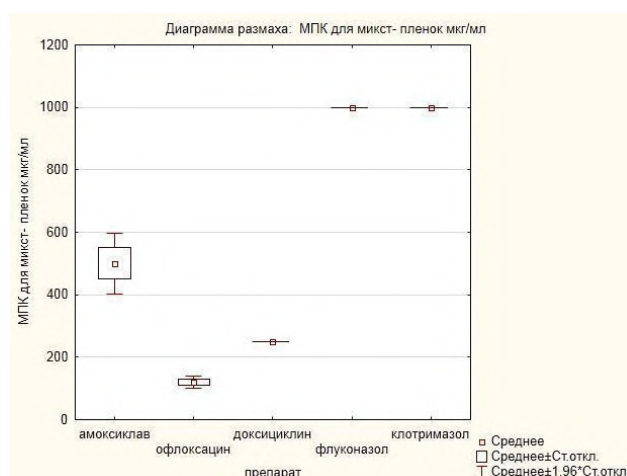
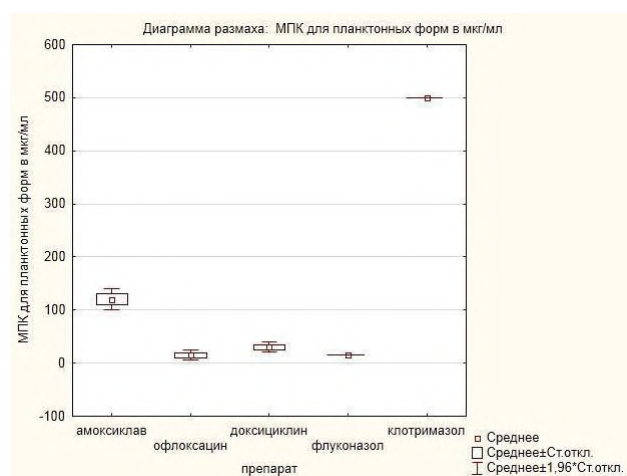


Рисунок 2 – Диаграммы размаха, МПК для планктонных форм и для микст- пленок.

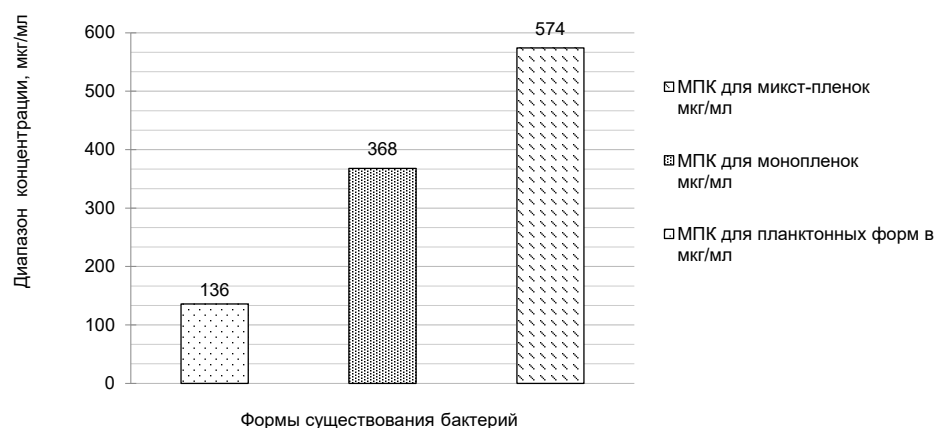


Рисунок 3 – Средние значения МПК мкг/мл препаратов для разных форм существования *E.coli* и *C.albicans*.



Рисунок 4 – МБК доксициклина для планктонных форм *E.coli*=60 мкг/мл.

бактерицидными для планктонных форм (рис. 1), продемонстрировало наличие микроорганизмов. Это еще раз подтверждает, что МБК препаратов для планктонных форм (рис. 4) меньше в десятки раз по сравнению с их пленочными аналогами. Также при микроскопии видна способность образовывать биопленки между штаммами дрожжей и кишечных палочек. Кроме того, клетки *E.coli* колонизировали поверхность превосходящих их по размерам грибов [28], создавая при этом дополнительный барьер для проникновения противогрибковых препаратов к клеткам *C.albicans* (рис. 1).

С одной стороны, наличие антибиотикорезистентности зависит от способности микроорганизмов состоять в биопленочном сообществе (quorum sensing; QS) [7, 8], с другой – сама способность образовывать биопленки повышает шансы на устойчивость, по этой причине микро-

организм стремится к ее приобретению. Бактерии в составе биопленки не просто физически менее доступны, но и повышают вероятность обмена генетической информацией, а на этапе диспергирования биопленки остаются неуязвимыми.

## Заключение

Исследуемые клинические изоляты *C.albicans* 2924 и *E.coli* 2646 способны образовывать биопленки, что ведет к усилению резистентности. Взаимовлияние между участниками ассоциаций в структуре биопленок приводит к отягощению течения заболевания в связи с неэффективным воздействием терапевтических препаратов. Бактериальные биопленки обладают различной степенью толерантности в зависимости от стадий пленкообразования как к антибиотикам, так и к иммунокомпетентным клеткам [33]. С каждым последующим, неэффективным для их удаления из организма воздействием АБ участники кворума приобретают устойчивость, стремясь к мультирезистентности.

Назначение рациональной антибиотикотерапии и разработка протоколов эмпирической антибактериальной терапии нуждаются в определении чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам в планктонном состоянии, а также в состоянии биопленки. Актуальным является изучение механизмов резистентности бактерий в составе микробных сообществ.

Стандартная терапия высокими дозами антибиотиков токсична для макроорганизма, что диктует необходимость апробации новых ве-



ществ с высоким потенциалом действия на биопленки.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность старшему лаборанту кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени С.И.Гельберга УО «Гродненский государственный медицинский университет» Домостой Елене Анатольевне за оказанное содействие при проведении исследований.

**Acknowledgement.** The authors express their gratitude to the senior laboratory assistant of the Chair of Microbiology, Virology and Immunology named after S.I. Gelberg of Grodno State Medical University Domostoy E.A. for the help provided while conducting investigations.

## Литература

1. Эпиднадзор за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Европе [Электронный ресурс] : CAESAR 2019 г. : практ. пособие / ВОЗ, Европ. Регион. бюро. – Режим доступа: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0013/430132/WHO-CAESAR-manual-2019-RUS.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0013/430132/WHO-CAESAR-manual-2019-RUS.pdf). – Дата доступа: 26.01.2021.
2. Европейский стратегический план действий по проблеме устойчивости к антибиотикам [Электронный ресурс] : 61-я сес., Баку, Азербайджан, 2011 г. / ВОЗ, Европ. Регион. комитет. – Режим доступа: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0015/150612/RC61\\_Res\\_r06.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0015/150612/RC61_Res_r06.pdf). – Дата доступа: 26.01.2021.
3. Гаврилова, И. А. Устойчивость госпитальных изолятов стафилококков и синегнойной палочки к дезинфицирующим средствам / И. А. Гаврилова, Л. П. Титов // Здоровоохранение. – 2011. – № 11. – С. 18–20.
4. Афиногенова, А. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Афиногенова, Е. Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3. – С. 119–125.
5. Biofilm formation as a response to ecological competition / N. M. Oliveira [et al.] // PLoS Biol. – 2015 Jul. – Vol. 13, N 7. – e1002191.
6. Современные представления о механизмах взаимодействия биопленки и факторов клеточного иммунитета / Н. М. Шлепотина [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2020. – Т. 97, № 1. – С. 83–90.
7. Механизмы выживания бактерий / О. В. Бухарин [и др.]. – Москва : Медицина, 2005. – 367 с.
8. Biradar, B. Quorum sensing in plaque biofilms: challenges and future prospects / B. Biradar, P. Devi // J. Contemp. Dent. Pract. – 2011 Nov. – Vol. 12, N 6. – P. 479–485.
9. Методы культивирования и изучения бактериальных биопленок / И. Р. Симонова [и др.] // Изв. высш. учеб. заведений. Северо-Кавказ. регион. Естеств. науки. – 2017. – № 1. – С. 75–81.
10. Hooshangi, S. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications / S. Hooshangi, W. E. Bentley // Curr. Opin. Biotechnol. – 2008 Dec. – Vol. 19, N 6. – P. 550–555.
11. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Hoiby [et al.] // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010 Apr. – Vol. 35, N 4. – P. 322–332.
12. Petrova, O. E. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion / O. E. Petrova, K. Sauer // Curr. Opin. Microbiol. – 2016 Apr. – Vol. 30. – P. 67–78.
13. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains / R. Gopal [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2014. – Vol. 58, N 3. – P. 1622–1629.
14. Чернявский, В. И. Бактериальные биопленки и инфекции / В. И. Чернявский // Ann. Mechnikov Inst. – 2013. – N 1. – P. 86–90.
15. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования : учеб.-метод. пособие / А. М. Марданова [и др.]. – Казань : Центр печати «Линк», 2016. – 48 с.
16. Льюис, К. Персистирующие клетки и загадка выживания биопленок / К. Льюис // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 327–336.
17. Lafleur, M. D. Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans* / M. D. Lafleur, Q. Qi, K. Lewis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010 Jan. – Vol. 54, N 1. – P. 39–44.
18. Jorge, P. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches / P. Jorge, A. Lourenco, M. O. Pereira // Biofouling. – 2012. – Vol. 28, N 10. – P. 1033–1061.
19. Волосач, О. С. Ведущие возбудители инфекций мочевыводящих путей пациентов Гродненского региона в 2018 году [Электронный ресурс] / О. С. Волосач, С. Е. Петрова, Н. С. Маркович // Актуальные вопросы микробиологии, инфектологии и иммунологии : сб. материалов межвуз. конф., посвящ. памяти проф. С. И. Гельберга, Гродно, 29 апр. 2019 г. – Гродно, 2019. – С. 30–33. – 1 электрон. опт. диск.
20. Поздеев, О. К. Энтеробактерии : рук. для врачей / О. К. Поздеев, Р. В. Федоров. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 720 с.
21. Donlan, R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan, J. W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002 Apr. – Vol. 15, N 2. – C. 167–193.
22. Delaloye, J. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient / J. Delaloye, T. Calandra // Virulence. – 2014 Jan. – Vol. 5, N 1. – P. 161–169.
23. Mills, B. B. Vaginitis: beyond the basics / B. B. Mills // Obstet. Gynecol. Clin. North. Am. – 2017 Jun. – Vol. 44, N 2. – P. 159–177.
24. Biofilms formed by isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis patients are heterogeneous and insensitive to fluconazole / L. Sherry [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2017 Aug. – Vol. 61, N 9. – e01065-17.
25. Вульвовагинальный кандидоз: клинические и терапевтические аспекты в практике акушера-гинеколога / Г. Р. Байрамова [и др.] // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучения. – 2017. – № 4. – С. 63–69.
26. Концевая, И. И. Микробиология: культивирование и рост бактерий : практ. рук. для студентов биол. спец. вузов / И. И. Концевая. – Чернигов : Десна полиграф, 2017. – 44 с.
27. Тапальский, Д. В. Определение чувствительности к ан-

тибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех / Д. В. Тапальский, И. А. Бильский // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия*. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 62–67.

28. DEN-1 DEN-1B. Денситометр. Детектор мутности суспензий [Электронный ресурс] : инструкция пользователя / Biosan SIA. – Режим доступа: [https://biosan.lv/media/products/files/den-1-den-1b-ru204-0319\\_D7XD9aA.pdf](https://biosan.lv/media/products/files/den-1-den-1b-ru204-0319_D7XD9aA.pdf). – Дата доступа: 26.01.2021.
29. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms / G. Ramage [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001 Sep. – Vol. 45, N 9. – P. 2475–2479.
30. Лысак, В. В. Микробиология : практикум / В. В. Лысак,

Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Минск : БГУ, 2015. – 115 с.

31. Соколова, Т. Н. Микробные биопленки и способы их обнаружения / Т. Н. Соколова // *Журн. ГрГМУ*. – 2014. – № 4. – P. 12–15.
32. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing / C. G. Pierce [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2008. – Vol. 3, N 9. – P. 1494–1500.
33. Зинченко, А. И. Биопленки микроорганизмов и методы борьбы с ними / А. И. Зинченко // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты* : сб. ст. / редкол.: Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2016. – Т. 8. – С. 334–352.

Поступила 15.12.2020 г.

Принята в печать 15.02.2021 г.

## References

1. VOZ, Evrop Region biuro. Antimicrobial resistance surveillance in Central Asia and Europe [Elektronnyi resurs]: CAESAR 2019 g: prakt posobie. Rezhim dostupa: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0013/430132/WHO-CAESAR-manual-2019-RUS.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0013/430132/WHO-CAESAR-manual-2019-RUS.pdf). Data dostupa: 26.01.2021. (In Russ.)
2. VOZ, Evrop Region komitet. European strategic action plan on antibiotic resistance [Elektronnyi resurs]: 61-ia ses, Baku, Azerbaidzhan, 2011 g. Rezhim dostupa: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0015/150612/RC61\\_Res\\_r06.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0015/150612/RC61_Res_r06.pdf). Data dostupa: 26.01.2021. (In Russ.)
3. Gavrilova IA, Titov LP. Resistance of hospital isolates of staphylococci and *Pseudomonas aeruginosa* to disinfectants. *Zdravookhranenie*. 2011;(11):18-20. (In Russ.)
4. Afinogenova AG, Darovskaia EN. Microbial biofilms of wounds: state of the art. *Travmatologiya i Ortopediya Rossii*. 2011;(3):119-25. (In Russ.)
5. Oliveira NM, Martinez-Garcia E, Xavier J, Durham WM, Kolter R, Kim W, et al. Biofilm formation as a response to ecological competition. *PLoS Biol*. 2015 Jul 9;13(7):e1002191. doi: 10.1371/journal.pbio.1002191
6. Shlepota NM, Peshikova MV, Kolesnikov OL, Shishkova IuS. Modern concepts of the mechanisms of interaction between biofilm and cellular immunity factors. *Zhurn Mikrobiologii Epidemiologii Immunologii*. 2020;97(1):83-90. (In Russ.)
7. Bukharin OV, Gintzburg AL, Romanova IuM, El-Registan GI. Bacterial survival mechanisms. Moscow, RF: Meditsina; 2005. 367 p. (In Russ.)
8. Biradar B, Devi P. Quorum sensing in plaque biofilms: challenges and future prospects. *J Contemp Dent Pract*. 2011 Nov;12(6):479-85. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1080
9. Simonova IR, Golovin SN, Verkina LM, Bereznik EA, Titova SV. Cultivation and study methods of bacterial biofilms. *Izv Vyssh Ucheb Zavedenii Severo-Kavkaz Region Estestv Nauki*. 2017;(1):75-81. (In Russ.)
10. Hooshangi S, Bentley WE. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2008 Dec;19(6):550-5. doi: 10.1016/j.copbio.2008.10.007
11. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Apr;35(4):322-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
12. Petrova OE, Sauer K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr Opin Microbiol*. 2016 Apr;30:67-78. doi: 10.1016/j.mib.2016.01.004
13. Gopal R, Kim YG, Lee JH, Lee SK, Chae JD, Son BK, et al. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1622-9. doi: 10.1128/AAC.02473-13
14. Cherniavskii VI. Bacterial biofilms and infections. *Ann Mechnikov Inst*. 2013;(1):86-90. (In Russ.)
15. Mardanov AM, Kabanov DA, Rudakova NL, Sharipova MR. Biofilms: basic principles of organization and research methods: ucheb-metod posobie. Kazan, RF: Tsentr pechati Link; 2016. 48 p. (In Russ.)
16. Liuis K. Persistent cells and the mystery of biofilm survival. *Biokhimiia*. 2005;70(2):327-36. (In Russ.)
17. Lafleur MD, Qi Q, Lewis K. Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):39-44. doi: 10.1128/AAC.00860-09
18. Jorge P, Lourenco A, Pereira MO. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. *Biofouling*. 2012;28(10):1033-61. doi: 10.1080/08927014.2012.728210
19. Volosach OS, Petrova SE, Markovich NS. Leading causative agents of urinary tract infections in patients of Grodno region in 2018 [Elektronnyi resurs]. V: Aktual'nye voprosy mikrobiologii, infektologii i immunologii: sb materialov mezvuz konf, posviashch pamiati prof SI Gel'berga, Grodno, 29 apr 2019 g. Grodno, RB; 2019. P. 30-3. 1 elektron opt disk. (In Russ.)
20. Pozdeev OK, Fedorov RV. Enterobacteriaceae: ruk dlia vrachei. Moscow, RF: GEOTAR-Media; 2007. 720 p. (In Russ.)
21. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93. doi: 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002
22. Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*. 2014 Jan;5(1):161-9. doi: 10.4161/viru.26187
23. Mills BB. Vaginitis: beyond the basics. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2017 Jun;44(2):159-177. doi: 10.1016/j.ogc.2017.02.010



24. Sherry L, Kean R, McKloud E, O'Donnell LE, Metcalfe R, Jones BL, et al. Biofilms formed by isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis patients are heterogeneous and insensitive to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Aug 24;61(9):e01065-17. doi: 10.1128/AAC.01065-17
25. Bairamova GR, Baranov II, Pripitnevich TV, Chernova VF. Vulvovaginal candidiasis: clinical and therapeutic aspects in the practice of an obstetrician-gynecologist. *Akusherstvo i ginekologiya: novosti, mneniya, obucheniya.* 2017;(4):63-9. (In Russ.)
26. Kontsevaia II. Microbiology: Cultivation and Growth of Bacteria: prakt ruk dlia studentov biol spets vuzovia. Chernihiv, Ukraine: Desna poligraf; 2017. 44 p. (In Russ.)
27. Tapalskii DV, Bilskii IA. Determination of antibiotic susceptibility by broth microdilution: a modification available to all: modifikatsiia, dostupnaia dlia vsekh. *Klin Mikrobiologiya Antimikrob Khimioterapiia.* 2018;20(1):62-7. (In Russ.)
28. Biosan SIA. DEN-1 DEN-1B. Densitometer. Suspension turbidity detector [Elektronnyi resurs]: instruktsiia pol'zovatelia. Rezhim dostupa: [https://biosan.lv/media/products/files/den-1-den-1b-ru204-0319\\_D7XD9aA.pdf](https://biosan.lv/media/products/files/den-1-den-1b-ru204-0319_D7XD9aA.pdf). Data dostupa: 26.01.2021. (In Russ.)
29. Ramage G, Walle KV, Wickes BL, Lo'pez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Sep;45(9):2475-9. doi: 10.1128/aac.45.9.2475-2479.2001
30. Lysak VV, Zheldakova RA, Fomina OV. Microbiology: praktikum. Minsk, RB: BGU; 2015. 115 p. (In Russ.)
31. Sokolova TN. Microbial biofilms and methods for their detection. *Zhurn GrGMU.* 2014;(4):12-5. (In Russ.)
32. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc.* 2008;3(9):1494-500. doi: 10.1038/nprot.2008.141
33. Zinchenko AI. Biofilms of microorganisms and methods of combating them. V: Kolomiets EI, Lobanok AG, Zinchenko AI, Galushko VM, Ivshina IB, Mikhailova RV, i dr, redkol. *Mikrobyne biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sb st. Minsk, RB; 2016. T 8. P. 334-52. (In Russ.)*

Submitted 15.12.2020

Accepted 15.02.2021

#### Сведения об авторах:

Артюх Т.В. – ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга, Гродненский государственный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7368-0623>;

Соколова Т.Н. – к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга, Гродненский государственный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4075-4515>;

Островская О.Б. – к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга, старший научный сотрудник группы морфологии с электронной микроскопией научно-исследовательской лаборатории, Гродненский государственный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3513-2014>.

#### Information about authors:

Artsiukh T.V. – lecturer of the Chair of Microbiology, Virology and Immunology named after S.I. Gelberg, Grodno State Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7368-0623>;

Sokolova T.N. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Microbiology, Virology and Immunology named after S.I. Gelberg, Grodno State Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4075-4515>;

Astrowskaja A.B. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Microbiology, Virology and Immunology named after S.I. Gelberg, senior researcher of morphology group with electron microscopy of the Research Laboratory, Grodno State Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3513-2014>;

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, г.Гродно, 230009, ул. Горького, 80, Гродненский государственный медицинский университет, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга.

E-mail: [taniaartsiukh@gmail.com](mailto:taniaartsiukh@gmail.com) – Артюх Татьяна Валерьевна.

**Correspondence address:** Republic of Belarus, 230009, Grodno, 80 Gorky str., Grodno State Medical University, Chair of Microbiology, Virology and Immunology named after S.I. Gelberg. E-mail: [taniaartsiukh@gmail.com](mailto:taniaartsiukh@gmail.com) –Tatiana V. Artsiukh.